

promoter により駆動される。chicken  $\beta$ -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit  $\beta$ -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている (図 1)。

EcoRI にて直鎖状にした pCAGGS ベクターに、上記で得られた mBD-6 cDNA を含む DNA 断片をライゲーションし、大腸菌内で増幅した。この mBD-6 cDNA を含む pCAGGS ベクター 100  $\mu$ g を、BamH I, Dra I, Sal I, Pst I により切断し、0.8% アガロースゲルにて電気泳動し、mBD-6 cDNA を含む 2.1 kb の DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を精製し、トランスジーンとして T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> 液に溶解した。

### 3) トランスジェニックマウスの作製

上記のトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操

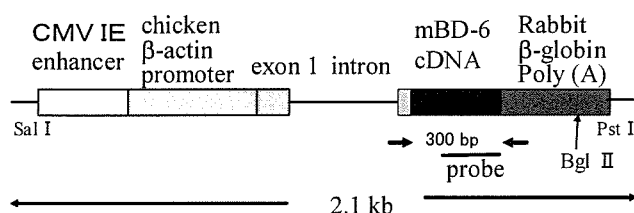


図 1 トランスジーン構成.

mBD-6 を過剰発現するために、pCAGGS ベクターを利用した。矢印は、スクリーニングに使用した PCR プライマーの位置を示す。Probe は、サザンブロットに利用したプローブの位置を示す。

CMV IE enhancer;  
cytomegalovirus immediate-early enhancer

作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。得られたマウスの尾よりゲノム DNA を Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて抽出し、PCR 法によりスクリーニングを行った。

我々は、まず、トランスジーン of rabbit  $\beta$ -globin 遺伝子上にセンスプライマー (5'-GGTTATTGTGCTGTCTCATC-3') およびアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を mBD-6 cDNA を挟むように作製した (図 1)。抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、Taq polymerase (TAKARA) を用いて、94 °C 30 秒、58 °C 45 秒、72 °C 1 分、35 サイクルの条件で PCR を施行した。

さらに、我々は、サザンブロット法により、トランスジーンを確認し、そのコピー数の推定を行った。すなわち、マウスのゲノム DNA 5  $\mu$ g を Bgl II により切断し電気泳動した後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスファーした。サザンブロットのためのプローブは、mBD-6 遺伝子第二エクソンの一部からなる、250 bp の DNA フラグメントを利用した。なお、このフラグメントは、mBD-6 遺伝子を含む BAC クローン D11 をテンプレートとして、mBD-6 遺伝子第二エクソン上の二つのプライマー (5'-AATCCAGTAACATGCATGAG-3'、5'-TGTGCATATTCACGAAGAAG-3') を用いて PCR を施行することにより得た。

上記 DNA フラグメントを、random primed DNA labeling kit (Roche) を用いて、[<sup>32</sup>P]dCTP によりラベルし、ExpressHyb Hybridization Solution

(Clontech) を用いて、60 °C、一晩、ハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出には、BASS2000 (富士フィルム) を用いた。

2系統において、次世代への遺伝が確認されたが、一方の系統 TgCAGmBD6-1 マウスは、ICR で維持し、もう一方の系統 TgCAGmBD6-2 マウスは、C57BL6/J で維持した。ただし、免疫組織学的評価は、TgCAGmBD6-1 マウスを C57BL6/J マウスとバッククロスさせた後に施行した。

#### 4) RT-PCR

外来遺伝子の発現を確認するために、変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。これらの組織の全 RNA は、ISOGEN (Nippon gene) を用いてプロトコールに従い抽出した。抽出した 5 µg の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。PCR のプライマーとして、mBD-6 cDNA 上にセンスプライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3')、rabbit β-globin 上にアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を作製した。real-time PCR を、Fluorescent Quantitative Detection System Version 3.02 (LineGene) を用いて施行した。

#### 5) mBD-6 ペプチドの化学合成

hBD-2 や mBD-3 でのシグナルペプチドの切断箇所から、mBD-6 についてもシグナルペプチドの切断箇所を推定し、C 端より 40 残基からなるペプチドをペプチド研

究所にて化学合成した。3 つのジスルフィド結合を空気酸化の手法で合成し、合成物の逆相高速液体クロマトグラフィーにてシングルピークを確認し、最終産物を質量分析により解析した。合成ペプチドは、0.01% 酢酸水に溶解した。

#### 6) mBD-6 抗血清の作製

上記の通り化学的に合成した mBD-6 ペプチドを抗原として、ラビット抗血清をペプチド研究所にて作製した。

#### 7) 筋組織からのペプチドの抽出とウエスタンブロット

変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体窒素にて凍結した。組織 100mg あたり 1ml の ISOGEN (Nippon gene) を用いて筋組織をホモジナイズした後、プロトコールに従い蛋白を抽出した。抽出した蛋白のペレットから、0.5% 酢酸水に 4 °C 下、一晩で溶出した成分を 10% アンモニア水で中和した。上記サンプルをトリシン SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF 膜にトランスファーした。ブロットは、4% BSA を含む TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) 中に 1 時間浸した後、一次抗体として、上記の mBD-6 抗血清と 4 °C、一晩反応させた。洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG 抗体 (ICN) と室温にて一時間反応させ、シグナルは、ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

## 8) マウス筋力の評価

マウスを、高さ 20 cm に水平に置いた直径 10 cm の円形の網にぶらさげ、下の敷いたマット上に落下するまでの時間を 2 分間測定した。同じ個体につき 2 回テストを施行し、長い方の記録を採用した。

## 9) マウス筋組織標本の作製

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、目的の骨格筋を切り出した。切り出した骨格筋は、水で練ったトラガカントゴムを用いて、小コルク片に固定した後、液体窒素により冷却したイソペンタン内で急速に凍結した。この組織標本から、クライオスタット内で、厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) は、型通りに施行した。

## 10) 免疫染色

上記の通り作製した切片を乾燥後、アセトン液に 5 分間浸して、固定を行った。ジストロフィン、 $\alpha$ -ジストログリカン、ラミニンの検出には、蛍光抗体法を利用した。5% BSA 液にて 20 分間ブロッキングの後、一次抗体として、抗ジストロフィン抗体 (Santa Cruz)、 $\alpha$ -ジストログリカン (Santa Cruz)、抗ラミニン抗体 (LSL) と 4°C、一晩反応させた。洗浄後、二次抗体と室温にて一時間反応させた。洗浄後、vectashield (Vector) をマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。

Neural cell adhesion molecule (NCAM)、I $\kappa$ B $\alpha$ 、cleaved caspase 3、calpain 3 の検出には、酵素抗体法を利用し

た。すなわち、0.15% NaN<sub>3</sub>、0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノール液に 30 分浸すことにより、内因性のペルオキシダーゼを失活させた後、5% BSA 液にて 20 分間ブロッキングを行った。一次抗体として、抗 NCAM 抗体 (Chemicon)、抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体 (Santa Cruz)、抗 cleaved-caspase-3 抗体 (Trevigen)、抗 calpain-3 抗体を使用し、37 度 100 分もしくは 4°C、一晩反応させ、それぞれ、二次抗体として、HRP 結合抗ラット IgG (Biosource)、HRP 結合抗ラット IgG (Cappel) と室温にて一時間反応させた後、DAB NiCl 液に 15 分浸し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液を加えてシグナルを検出した。

## 11) 血清クレアチンキナーゼ活性の測定

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、血清を分離し、測定まで凍結保存した。血清中のクレアチンキナーゼ活性は、SRL にて UV 法により測定した。

## 12) Evans Blue 染色

PBS に溶解した 10 mg/ml の Evans Blue Dye 液をマウスの腹腔内に注射し、16 時間後に骨格筋を摘出した。10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し蛍光顕微鏡下で観察した。

## 13) マウス骨密度の測定

マウスの大腿骨を摘出し、骨量、骨密度を pQCT 骨密度測定装置により計測した。

## 14) hBD-3 の細胞毒性の評価

指定濃度の hBD-3 を含む PBS (+) 下

トリパンブルー染色を施行した。トリパンブルー染色は、培養液をトリパンブルー染色液に置換し、数分後に、染色液を再びPBS (+) 液に置換し、トリパンブルーにより青く染まる細胞を顕微鏡下で観察した。

次に、アポトーシスとネクローシスの寄与を評価するために、指定濃度の hBD-3 を含むPBS (+) 下で、培養細胞を5分間培養した後、ヨウ化プロピジウム (PI) とアネキシンV (BioVision) による染色をプロトコールに従い施行し、蛍光顕微鏡下で観察した。

## 15) TUNEL 染色

C2C12 細胞を、指定濃度の hBD-3 を含む 10% FCS 含有 DMEM 下で 400 分培養した後、4% パラホルムアルデヒドにて 30 分、室温で固定し、PBS (-) で洗浄し、以後、in situ cell death detection kit (Roche) を用いて、プロトコールに従い TUNEL 染色を施行した。

### (倫理面への配慮)

実験動物であるマウスに無用な苦痛を与えないように十分に配慮した。具体的には、採血や尾の採取は、エーテル麻酔下で行った。他の実験は、頸椎脱臼による速やかな安楽死の後に行った。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝子改変マウスの作製

6 匹の F0 マウスにおいて、PCR 法およびサザンブロット法により、トランスジェーンの挿入が確認され、2 系統において、次世代への遺伝が確認された。

サザンブロット法により、一方の系統で

ことが予想され、もう一方の系統では、トランスジェーンが 1 コピー含まれていることが予想された (図 2)。ここでは、これらの遺伝子改変マウスを、順に、TgCAGmBD6-1 マウス、TgCAGmBD6-2 マウスと呼ぶことにする。なお、3 匹のメスの F0 マウスは、仔を生まず、生後 3 ヶ月以内に死亡した。

## 2) TgCAGmBD6 マウスにおける mBD-6 過剰発現の解析

トランスジェーンの発現を、TgCAGmBD6 マウスの骨格筋より抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 法により確認した。

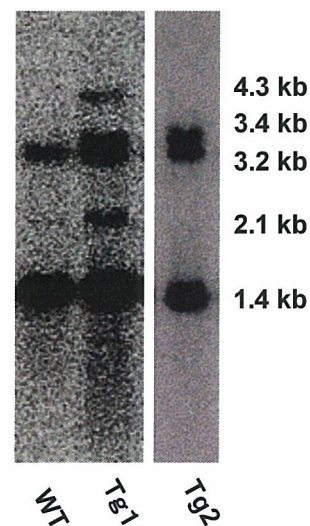


図 2. トランスジェーンのサザンブロット

野生型 (WT) では、内因性の mBD-6 遺伝子による 1.4kb のシグナルと偽遺伝子による 3.2kb のシグナルを認めた。TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) では、内因性のシグナルに加えて、トランスジェーンが隣接して挿入されたことと思われる 2.1 kb のシグナルと約 4.3 kb と 3.4 kb のシグナルを認めた。TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) では、約 3.4 kb の位置にのみトランスジェーンによるシグナルを認めた。

トランスジーンが発現を特異的に増幅するプライマーを用いることにより、TgCAGmBD-6 マウスのいずれの系統においても、トランスジーンが骨格筋に発現していることが確認された (図 3)。ゲノム上のコピー数に相関して、TgCAGmBD6-1 マウスでの発現は、TgCAGmBD6-2 マウスの 3.4 倍であった。

次に、我々は、蛋白レベルでの mBD-6 の発現量を確認するために、等量の骨格筋より抽出した蛋白をウエスタンブロットし、mBD-6 抗血清により解析した。図 4 のように TgCAGmBD6 マウスにおいてのみ、mBD-6 ペプチドを検出することができ、発現の上昇が蛋白レベルで確認された。しかし、TgCAGmBD6-1 マウスに比較し

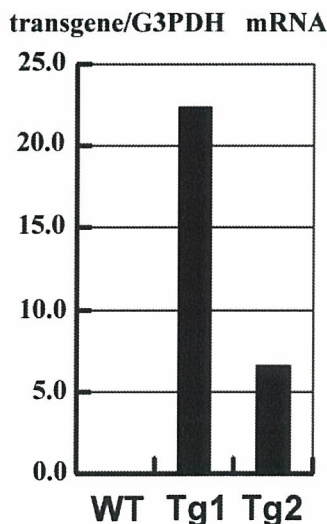


図 3. RT-PCR によるトランスジーン発現解析.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の骨格筋におけるトランスジーンが発現を real-time PCR により確認した。TgCAGmBD6-1 マウスでの発現は、TgCAGmBD6-2 マウスの 3.4 倍であった。

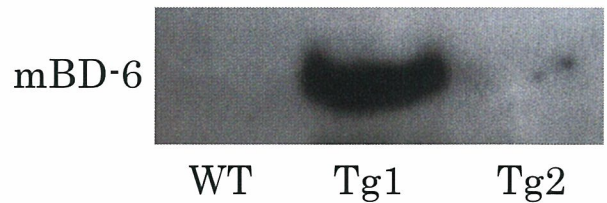


図 4. ウエスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の骨格筋より抽出した蛋白中に、4 kD の mBD-6 ペプチドが検出された。しかし、TgCAGmBD6-2 マウスの mBD-6 分泌量は、TgCAGmBD6-1 マウスに比べて非常に少なかった。

て、TgCAGmBD6-2 マウスでのシグナルは非常に弱く、mBD-6 の発現は、やはり TgCAGmBD6-1 マウスにて有意に高いことが示された。

### 3) TgCAGmBD6 マウスの低体重

出生時、TgCAGmBD6-1 マウスと野生型の同腹仔との間に外見上の相違は認められなかった (図 5A)。しかし、生後 6 週間頃には、TgCAGmBD6-1 マウスの低体重が認められるようになり、生後 8 週での平均体重は、野生型の同腹仔に比べて、優位に小さく、その約 80% であった (図 5B)。加齢に伴い、野生型では体重増加を続けるが、TgCAGmBD6-1 マウスでは、体重増加が認められず (図 5C)、そのほとんどは、生後 8-11 ヶ月後に死亡した。

TgCAGmBD6-1 マウスの寿命の短縮は、マウスのバックグラウンドを C57BL6/J にするとより顕著であった。C57BL6/J 系統の TgCAGmBD6-1 マウスでは、多くのマウスが生後 8 ヶ月以内に死亡し、一年以上生存したマウスはいなかった。

た。著明な体重減少以外に、癌などの特定の死因は認められず、老衰ともいふべき状態であった。

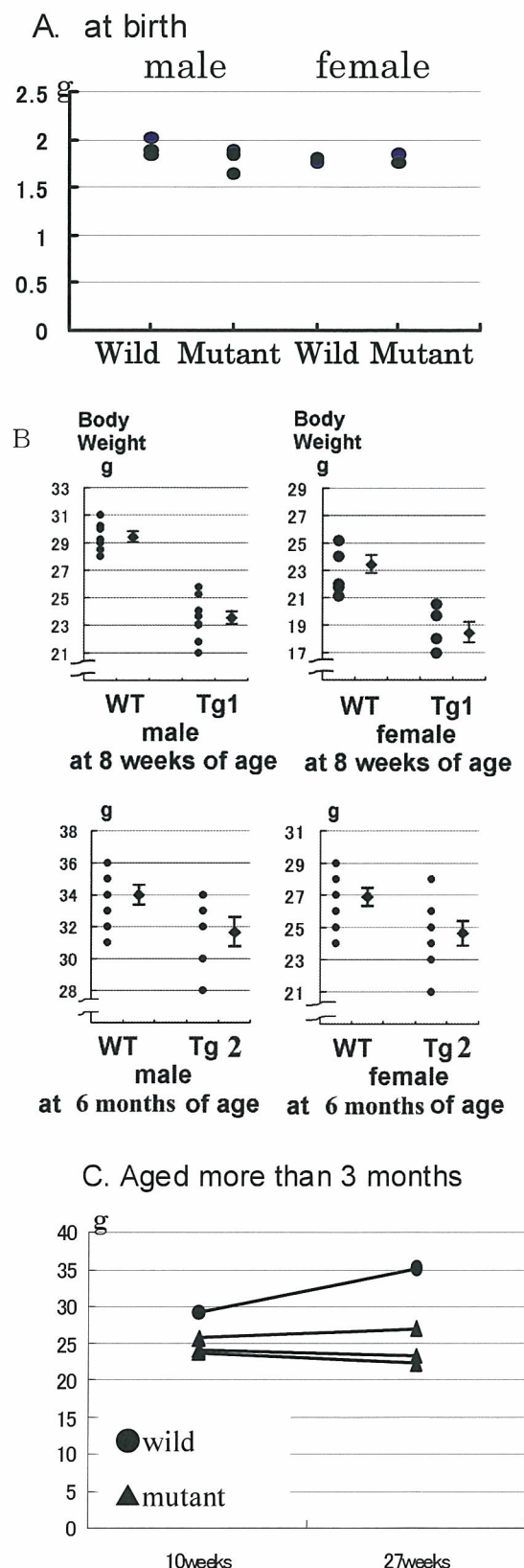
TgCAGmBD-6-2 マウスは、TgCAGmBD-6-2 マウスのような著しい低体重は示さないが、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD-6-2 マウスの体重は野生型の同腹仔と比較して有意に小さかった ( $p < 0.05$ ) (図 5)。TgCAGmBD-6-2 マウスは、1 年以上生存した。

#### 4) TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量

低体重に関連して、我々は、TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量を評価した。生後 5 週の TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量は、 $3.31 \pm 0.12$  g/日であり、野生型の同腹仔の摂食量は、 $4.00 \pm 0.29$  g/日であり、TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量が有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。

図 5. TgCAGmBD6-1 マウスの体重.

各時期の TgCAGmBD6-1 マウス (Mutant, Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の体重を野生型 (Wild, WT) と比較した。A. TgCAGmBD6-1 マウスの出生時の体重の比較。有意な差は認められなかった。B. 生後 8 週の TgCAGmBD6-1 マウスの体重を野生型同腹仔 (WT) と比較。TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) の体重は有意に軽い ( $p < 0.01$ )。生後 1 年の TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の体重を野生型同腹仔 (WT) と比較。TgCAGmBD6-2 マウスの体重は有意に軽い ( $p < 0.05$ )。C. ●、▲ は、生後 3 ヶ月以降の各個体の体重を示す。野生型では体重増加を続けるが、TgCAGmBD-6-1 マウスでは、体重増加が認められなかった。



## 5) TgCAGmBD6-1 マウスの筋力低下

興味深いことに、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスでは、進行性の亀背を認めた (図 6)。このような所見は、他の筋ジストロフィーマウスの多くで報告されたように、マウスにおける筋力低下の特徴的な所見である。

次に、生後 4 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスを水平においた網の下にぶらさげ、落下までの時間を比較した。ほとんどの野生型の同腹仔は、120 秒以上、体を保持していたが、多くの TgCAGmBD6-1 マウスが 60 秒以内に落下し ( $p < 0.01$ )、その筋力低下が確認された (図 7)。



図 6. TgCAGmBD6-1 マウスの亀背

生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスは、進行性の亀背を示した (矢印)。

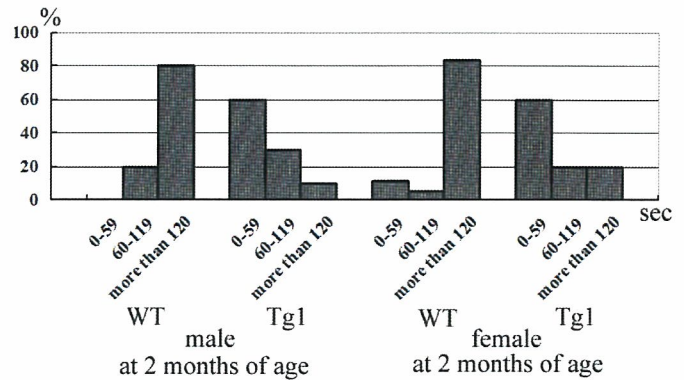


図 7. TgCAGmBD6-1 マウスの筋力テスト

生後 2 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) を水平においた網の下にぶらさげ、落下までの時間を比較した。グラフの縦軸は、体を保持したマウスの割合を示している。ほとんどの野生型の同腹仔は、120 秒以上、体を保持していたが、多くの TgCAGmBD6-1 マウスが 60 秒以内に落下した ( $p < 0.01$ )。

## 6) TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

我々は、生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の組織学的な解析を行った。TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の HE 染色において、筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立ち、肥大線維はしばしば分割して、いわゆる fiber splitting の所見を示した。さらに、エオジンに淡染する壊死線維や単核細胞の集簇巣が散在し、塩基性の再生線維も認められた (図 8)。これらの特徴は、調べたすべての骨格筋、すなわち、横隔膜、頸部の筋、背部の筋に共通して認められた。

筋の病理変化を経時的に評価するために、生後 20 日および生後 4 週の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋を解析した。生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウス

では、外見上も野生型の同腹仔と相違を認めず、病理学的にも骨格筋に異常を認めなかった (図 9)。

生後一ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋では、筋線維の壊死や単核細胞の集簇巣が、生後 3 ヶ月のマウスと同程度に認められた。しかし、多くの筋線維の核は、細胞内に偏在しており、壊死、再生の進行しつつある状態を示す所見であった (図 9)。

一方、TgCAGmBD-6-2 マウスは、生後 6 ヶ月ころまで、骨格筋の病理像において明らかな異常は認められなかった。しかし、生後 1 年の TgCAGmBD-6-2 マウスでは、少数の淡染する変性線維が認められた。また、生後 1 年の TgCAGmBD-6-2 マウスの腓腹筋において、同年齢の野生型マウスと比較して有意に多い中心核線維が認められた ( $2.5 \pm 0.5\%$  vs.  $0.2 \pm 0.1\%$ ) ( $p < 0.01$ ) (図 10)。

#### 7) TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見

我々は、生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性を測定した。図 11 のように、TgCAGmBD6-1 マウスの血清クレアチンキナーゼ活性の平均は、233 IU/l であり、野生型の同腹仔の血清クレアチンキナーゼ活性より有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。

#### 8) Evans Blue Dye 染色

図 12 は、Evans Blue Dye 染色の結果である。TgCAGmBD-6-1 マウスおよび生後 1 年の TgCAGmBD-6-2 マウスにおいて、Evans Blue Dye の細胞質に取り込まれた

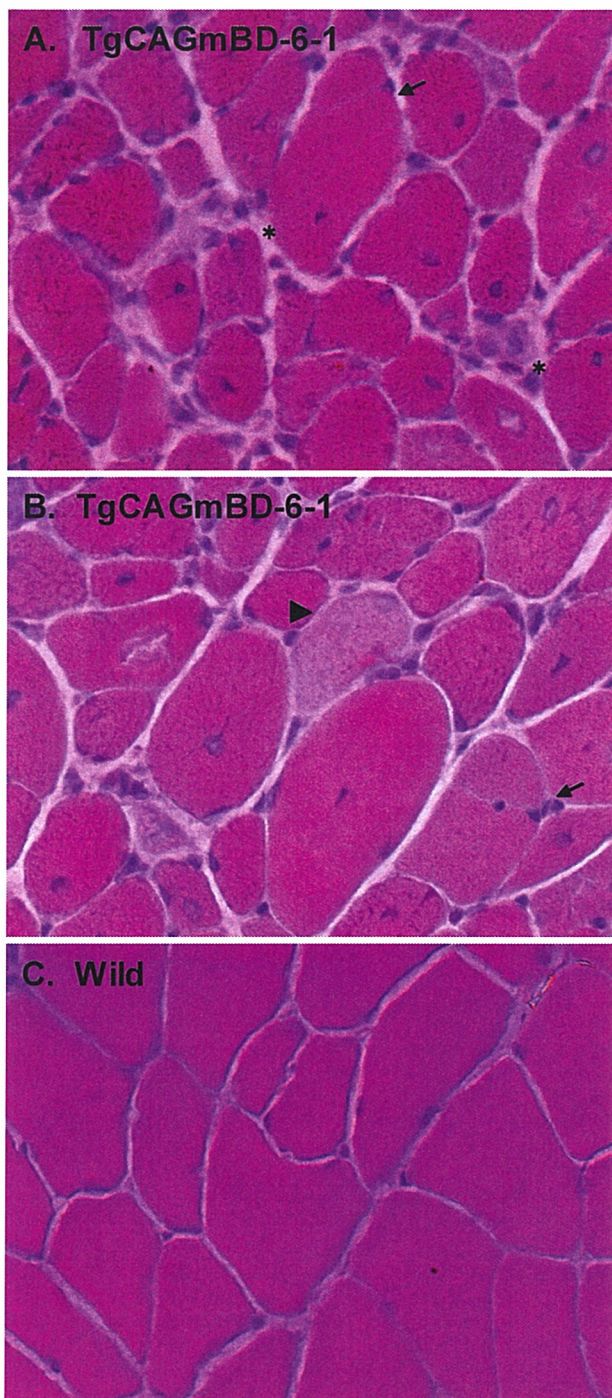


図 8. TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

A. B. 生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 オスマウスの腓腹筋の HE 染色所見。筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立つ。fiber splitting (矢印)、エオジンに淡染する壊死線維(矢頭)、単核細胞の集簇巣や塩基性の再生線維 (\*) が認められる。C. 野生型の腓腹筋所見。



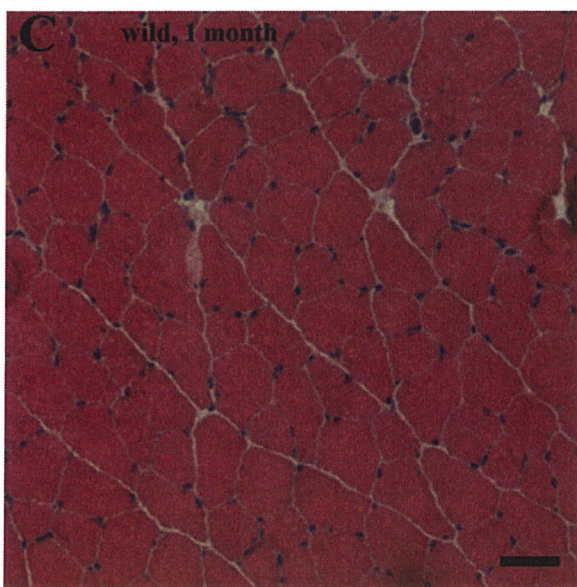
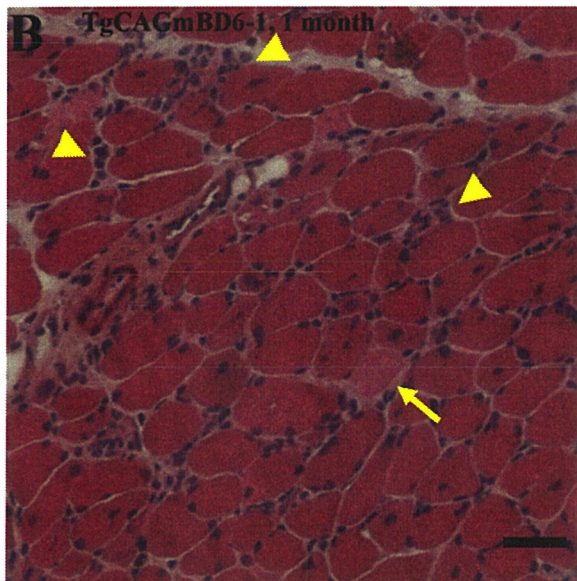
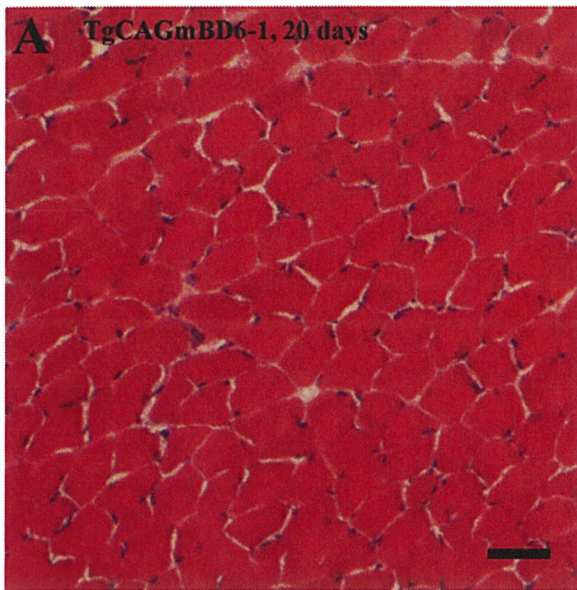


図 9. 生後 20 日から 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

A. 生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウスの腓腹筋の HE 染色所見。筋線維の変性や再生の所見は乏しい。B. 生後 4 週の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋では、筋線維の変性(矢印)や単核細胞の集簇(矢頭)が、生後 3 ヶ月のマウスと同程度に認められた。しかし、中心核線維はまだ少なかった。C. 生後 4 週の野生型マウスの骨格筋。

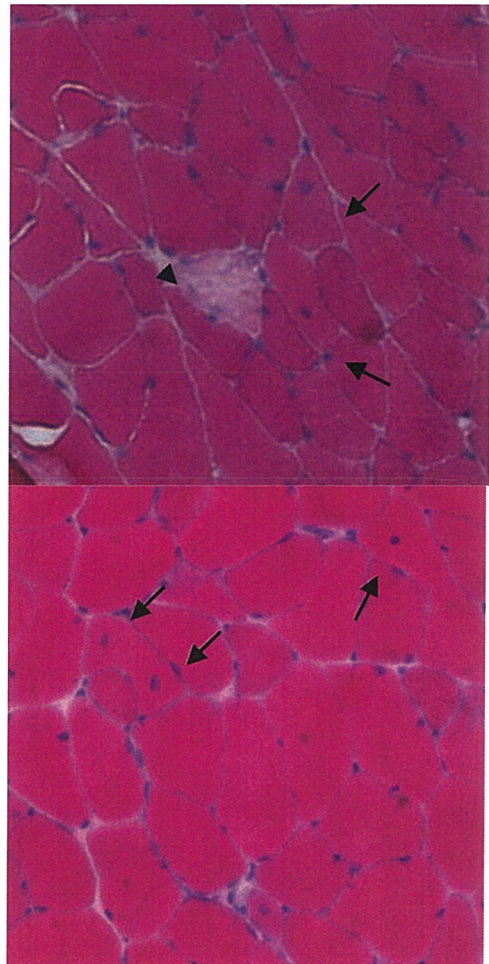


図 10. 生後 1 年の TgCAGmBD6-2 マウスの筋病理所見

生後 1 年の TgCAGmBD6-2 マウスの腓腹筋には、HE 染色において、筋線維の変性所見(矢頭)や中心核線維(矢)が少数認められた。中心核線維の割合は、同年齢の野生型マウスより有意に多かった ( $p < 0.01$ )。

### Serum Creatine Kinase Activity

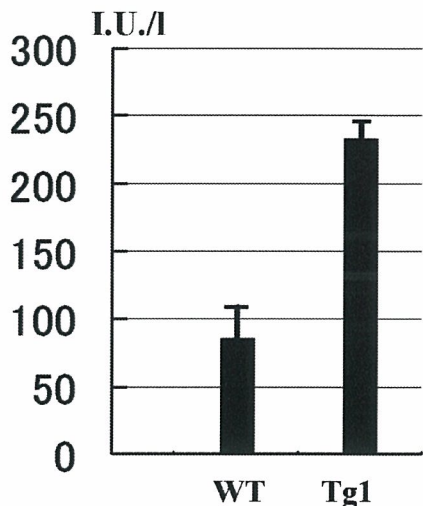


図 11. TgCAGmBD6-1 マウスの血清所見  
生後3ヶ月のTgCAGmBD6-1マウス(Tg1)と野生型(WT)の同腹仔の血清クレアチンキナーゼ活性を測定した。TgCAGmBD6-1マウスの血清クレアチンキナーゼ活性は、有意に高値であった( $p<0.01$ )。

### Evans Blue Dye labelling

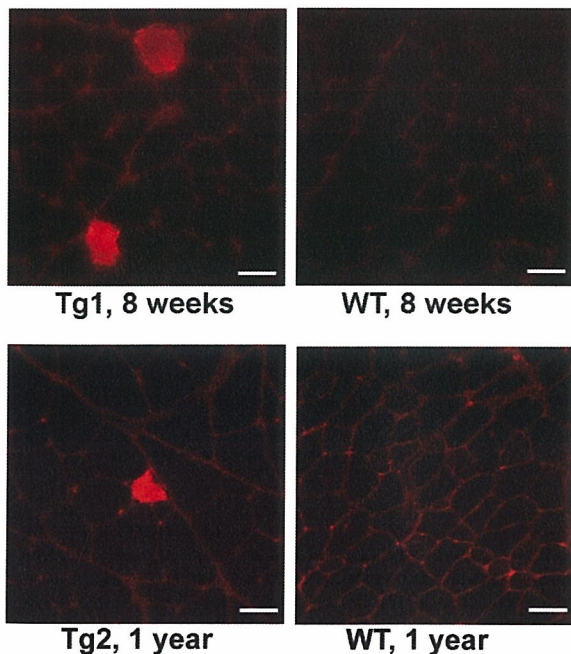


図 12. Evans Blue Dye 染色

TgCAGmBD6-1 マウス(Tg1)や生後1年のTgCAGmBD6-2 マウス(Tg2)において、Evans Blue Dyeの細胞質に取り込まれた筋線維が認められた。

筋線維が確認された。膜透過性の亢進した筋線維の存在を示しており、既知の筋ジストロフィーモデルマウスに認められる所見である。

### 8) TgCAGmBD6-1 マウスにおけるジストロフィン、ジストロフィン関連蛋白およびカルパイン3の染色

TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の病理変化が、筋ジストロフィーの病理所見に類似していたため、我々は、ジストロフィン、 $\alpha$ -ジストログリカン、ラミニンの免疫染色を行った。TgCAGmBD6-1 マウスの腓腹筋においても、野生型の同腹仔と同様に、筋膜に沿って存在するジストロフィンや $\alpha$ -ジストログリカン、ラミニンが明瞭に示され、ジストロフィンおよびジストロフィン関連蛋白の異常を疑わせる所見は認められなかった(図13)。同様に、カルパイン3の染色においても、明らかな異常は認められなかった(図13)。

### 9) TgCAGmBD6 マウスでの neural cell adhesion molecule の分布

我々は、TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の病理変化の機序について分子レベルで検討するために、いまだ病理変化の少ない

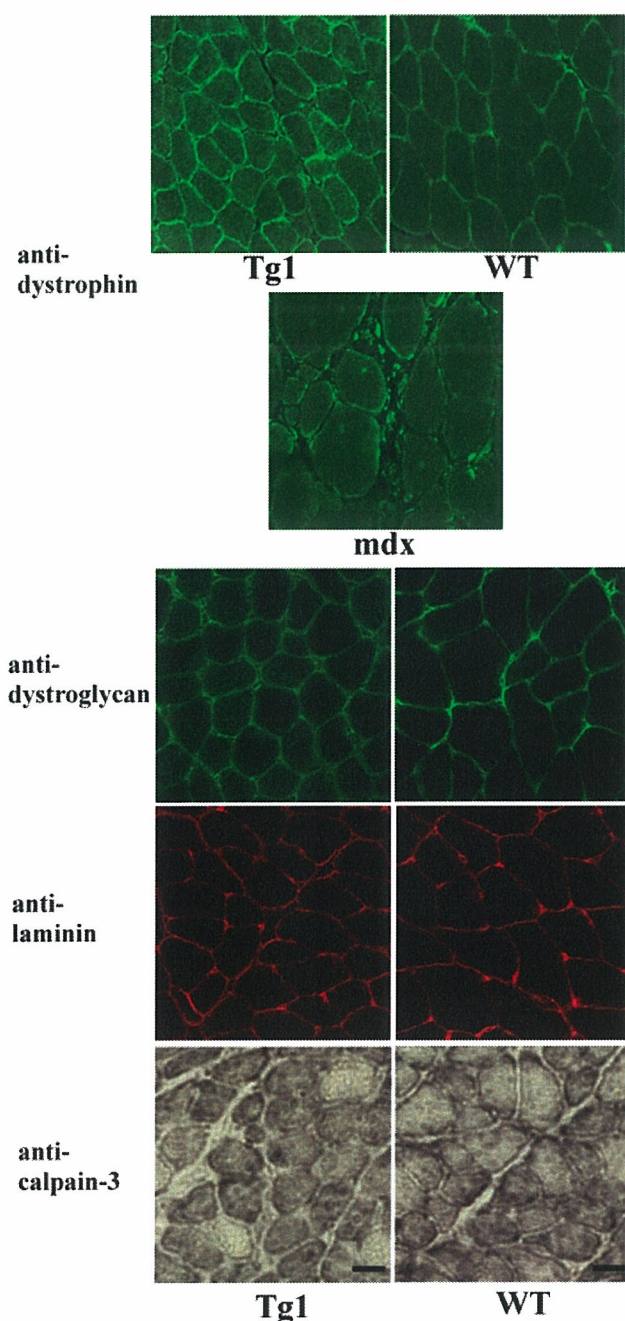


図 12. TgCAGmBD6-1 マウスのジストロフィン関連蛋白およびカルパイン 3 の染色

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) の腓腹筋においても、野生型と同様に、筋膜に沿って存在するジストロフィン関連蛋白が明瞭に示された。カルパイン 3 の発現も確認された。mdx マウスはジストロフィン欠損マウスであり、ジストロフィン抗体により筋膜が染色されない。Scale bars: 20  $\mu$ m

生後一ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの筋線維での neural cell adhesion molecule (NCAM) の分布を、免疫組織学的に評価した。一般に、成熟した筋線維では、NCAM は、神経筋接合部に局限して存在する。そのため、野生型の同腹仔では、その存在が検出できなかったが、TgCAGmBD6-1 マウスでは、細胞質全体に NCAM の存在する筋線維が多数認められた (図 13)。

TgCAGmBD6-2 マウスにおいても、生後 11-12 ヶ月になると多くの NCAM 陽性線維が認められ、同年齢の野生型の同腹仔では、少数の NCAM 陽性線維が認められるのみであった。

神経原性の筋線維変性においても NCAM の発現が上昇することが知られているが、TgCAGmBD6-1 マウスと野生型同腹仔において、脊髄の運動ニューロンの数、形態に明らかな異常は認められなかった。

#### 10) TgCAGmBD6 マウスの I $\kappa$ B $\alpha$ の分布

NCAM と同様に、I $\kappa$ B $\alpha$  についても、免疫染色によりその分布を評価した。生後 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスや生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、多くの筋線維で I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積が認められた。野生型同腹仔では、生後 12 ヶ月のマウスにおいて、少数、そのような筋線維が認められるのみであった (図 13)。

興味深いことに、calpain 3 の先天的な異常を原因とする LGMD2A 型筋ジストロフィーにおいて、同様の I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積が報告されており、蓄積した I $\kappa$ B $\alpha$  の核内移

行によるアポトーシスの惹起が、筋変性の原因と報告されている。我々も、TgCAGmBD-6 マウス骨格筋の連続切片をカスパーゼ 3 の活性型である cleaved caspase 3 の抗体により染色すると、I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積した筋線維の一部で、cleaved caspase 3 が染色され、アポトーシスシグ

ナルの活性化を示す所見が得られた(図 14)。

#### 11) TgCAGmBD6-1 マウスの骨密度

生後 3 ヶ月の TgCAGmBD-6-1 マウスの大腿骨の骨密度は、♂ 0.0451 g/cm<sup>2</sup>、♀ 0.0424 g/cm<sup>2</sup> であり、野生型の同腹仔

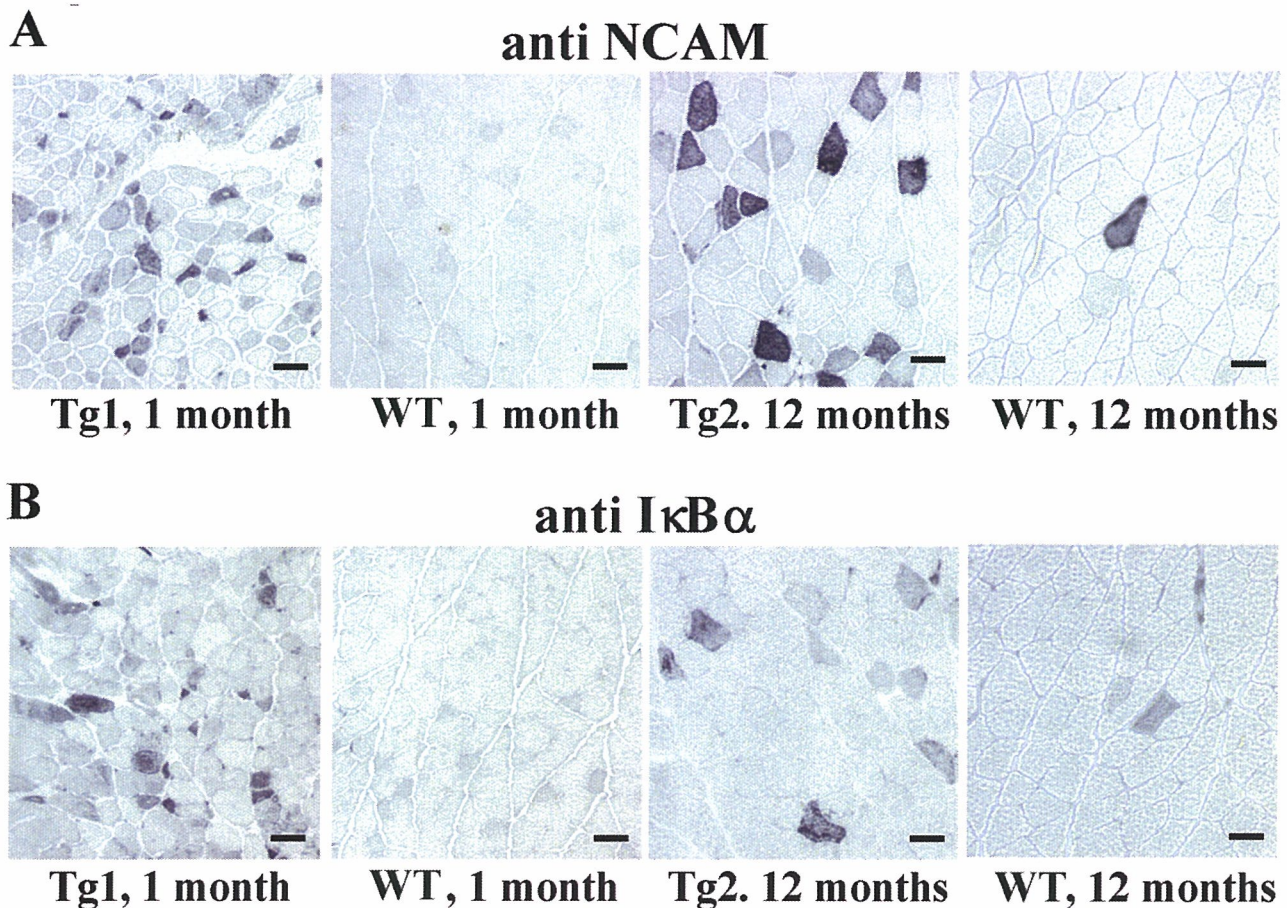


図 13. TgCAGmBD-6-1、TgCAGmBD-6-2 マウス骨格筋の NCAM および I $\kappa$ B $\alpha$  の免疫組織染色  
 若年の TgCAGmBD-6-1 マウス (Tg1) と生後一年の TgCAGmBD-6-2 マウス (Tg2) において NCAM および I $\kappa$ B $\alpha$  の染色を施行した。A. 生後 1 ヶ月の Tg1 および生後 12 ヶ月の Tg2 において、野生型の同腹仔と比較して、NCAM を高レベルに発現する筋線維が多数認められた。なお、野生型でも生後 12 ヶ月で、同様の筋線維が少数認められ、老化の影響も受けることが示された。B. I $\kappa$ B $\alpha$  についても同様に、生後 1 ヶ月の Tg1 および生後 12 ヶ月の Tg2 において、野生型の同腹仔と比較して、多くの筋線維が I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積の所見を示した。やはり、野生型でも生後 12 ヶ月で、同様の筋線維が少数認められ、老化の影響も受けることが示された。Scale bars: 40  $\mu$ m

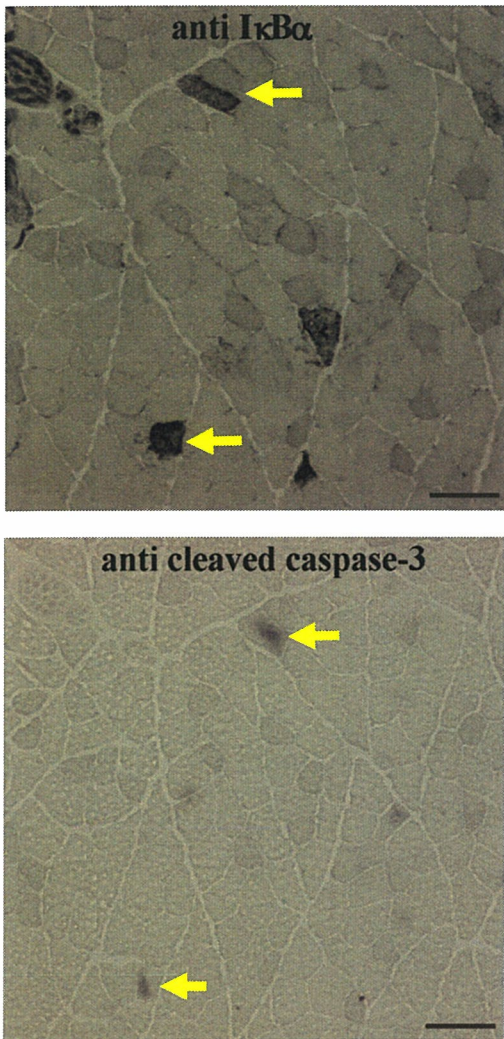


図 14. IκBα の蓄積した筋線維における caspase 3 活性

生後 12 ヶ月の TgCAGmBD6-2 マウス筋線維の連続切片による評価。IκBα の蓄積した筋線維のいくつかにおいて、アポトーシスに関わる活性型 caspase 3 の存在が示された。矢印は、同一筋線維であることを示している。Scale bars: 40 μm

の骨密度、♂ 0.0647 g/cm<sup>2</sup>、♀ 0.0590 g/cm<sup>2</sup> と比較して、有意に低値であった ( $p < 0.01$ ) (図 15)。

## 12) hBD-3 の細胞毒性の確認

ヒト肺由来の EBC-1 細胞に hBD-3 を投与し、30 分後にその細胞毒性をトリパンブルー染色により評価した。50 μg/ml 以上の hBD-3 投与後には、多数の細胞がトリパンブルー陽性であった。この強い細胞毒性は、同じくヒト肺由来の A549 細胞、マウス筋芽細胞由来の C2C12 細胞、マウス線維芽細胞のいずれに対しても認められた。

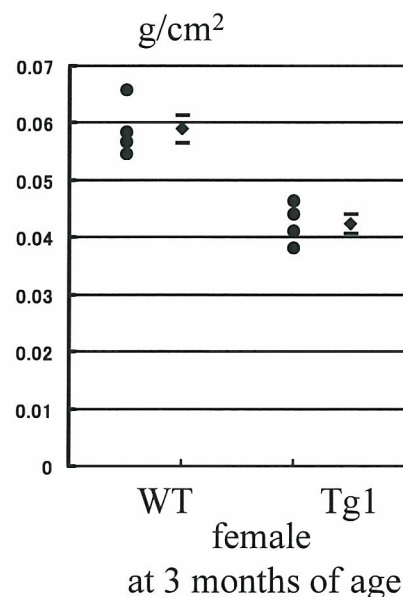
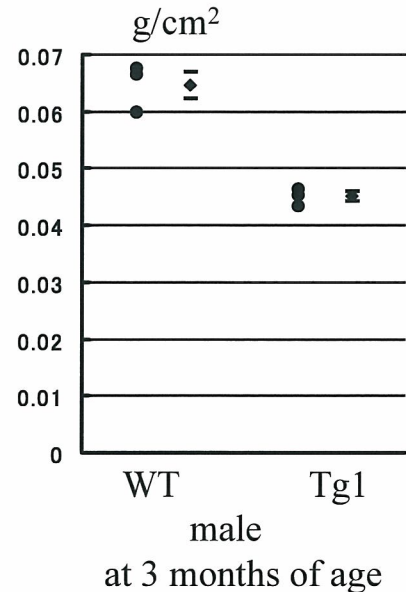


図 15. TgCAGmBD6-1 マウスの骨密度低下  
TgCAGmBD-6-1 (Tg1) マウスの大腿骨の骨密度は、野生型の同腹仔と比較して有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

### 13) アポトーシスとネクローシスに関する検討

hBD-3 投与直後、多くの EBC-1 細胞は、PI 陽性であり、膜透過性亢進による細胞死の所見を示した。アネキシンV陽性、PI 陰性で、アポトーシスの特徴を示す細胞は小数であった。一方、100  $\mu\text{g/ml}$  の hBD-3 投与下で 16 時間 C2C12 細胞を培養すると、TUNEL 陽性細胞も観察された。

### D. 考察

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、興味深い表現型を見出した。すなわち、TgCAGmBD6-1 マウスは、低体重、寿命の短縮、筋力低下、骨密度低下を示し、骨格筋には、筋線維の変

性と再生の所見が認められた。

生後 20 日頃までの TgCAGmBD6-1 マウスでは、正常の筋線維が主体であることから、骨格筋の発生過程に異常はないと考えられる。しかし、生後一ヶ月ころより、低体重が明らかとなり、進行性に筋力も低下し、生後 6 ヶ月ころには、一見して亀背が認められるようになった。実際、体重を保持する筋力の低下していることも明らかとなった。

一方、TgCAGmBD6-2 マウスは、TgCAGmBD6-1 マウスのような顕著な表現型は示さないものの、生後 6 ヶ月での有意な低体重、生後 1 年での筋線維の変性と中心核線維の増加が認められた。

さらに、免疫組織学的には、TgCAGmBD6-1 マウスと高齢の

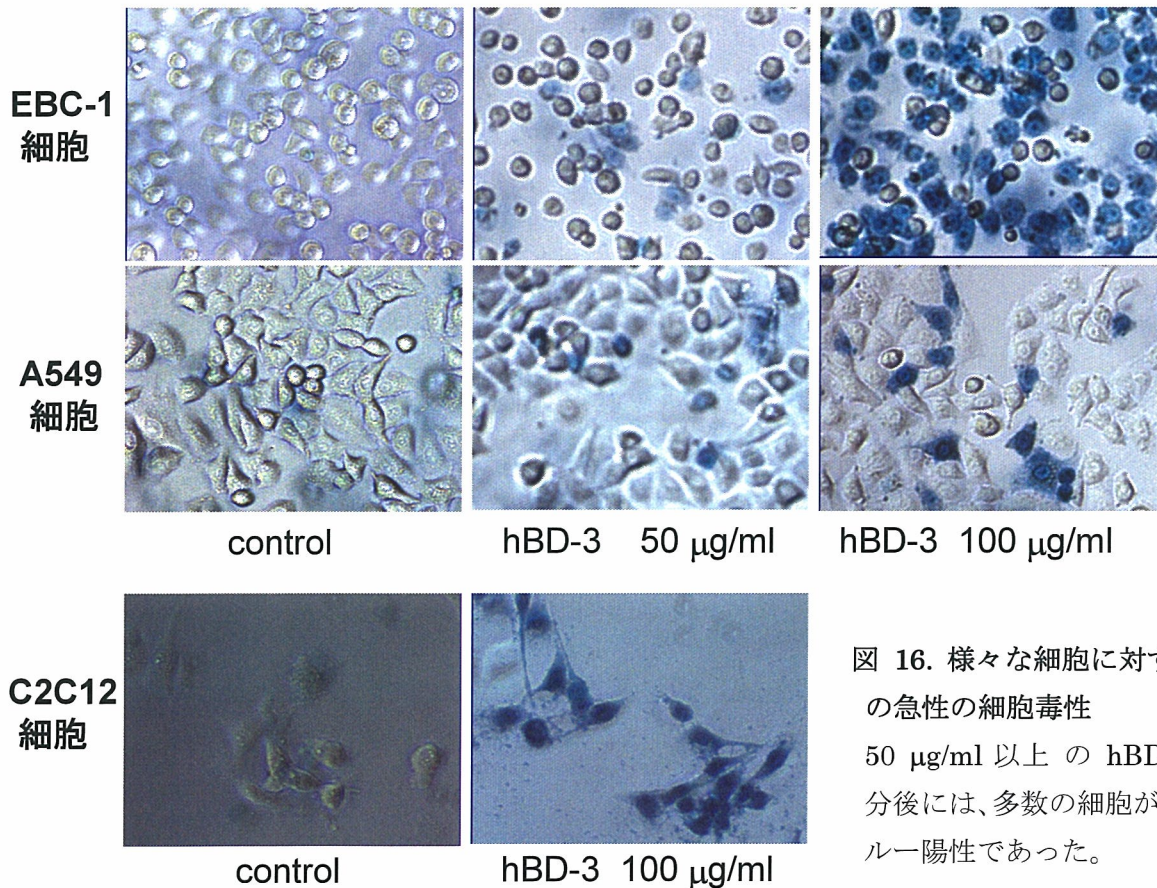


図 16. 様々な細胞に対する hBD-3 の急性の細胞毒性  
50  $\mu\text{g/ml}$  以上の hBD-3 投与 30 分後には、多数の細胞がトリパンブルー陽性であった。

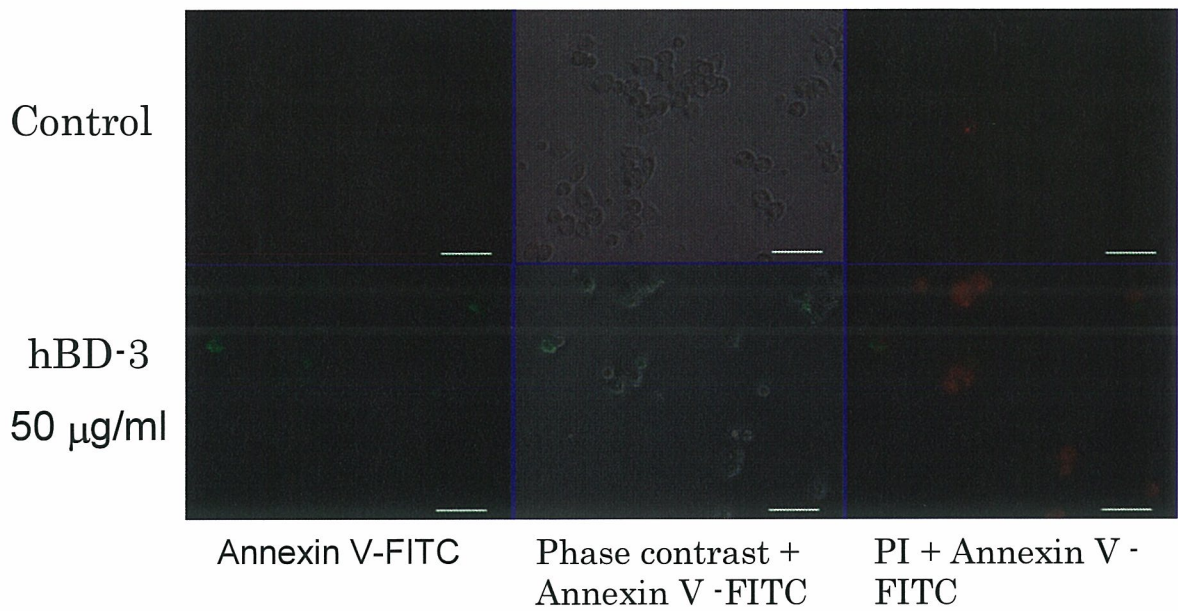


図 17. hBD-3 投与直後の EBC-1 細胞における PI およびアネキシン V による染色

EBC-1 細胞に、50 µg/ml の hBD-3 を投与し、投与 5 分後 PI およびアネキシン V による染色を施行した。緑色の蛍光を示す PI 陰性、アネキシン V 陽性の細胞が、ごく少数認められたが、大部分は、赤色の蛍光を示す PI 陽性の細胞であった。Control には、細胞傷害が認められない。Scale bars: 50µm

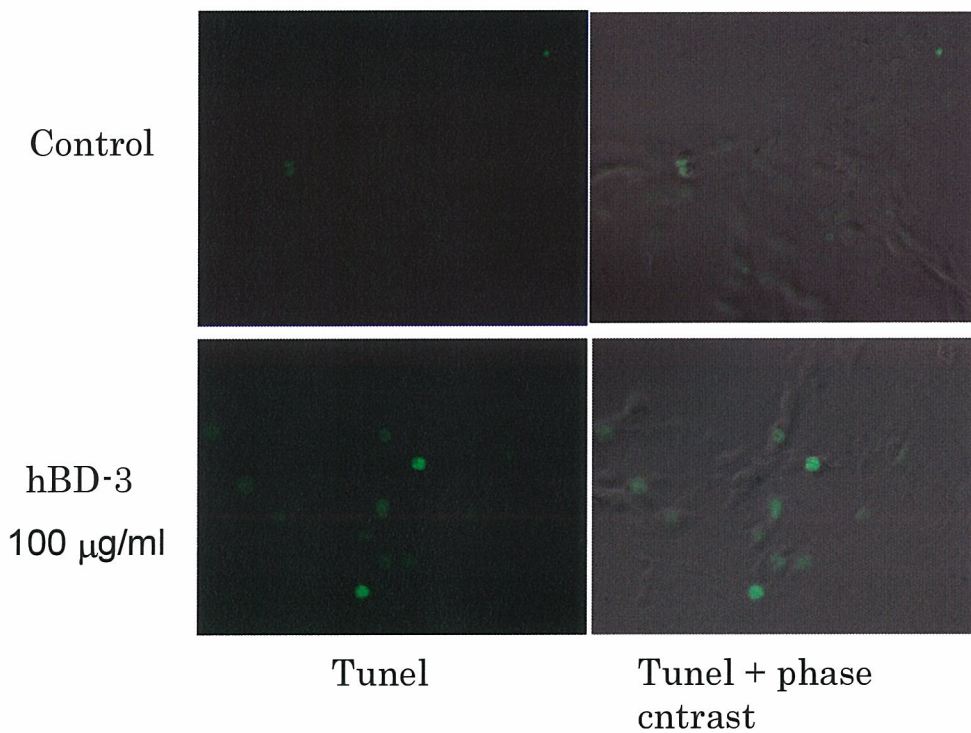


図 18. hBD-3 投与後の TUNEL 染色

C2C12 細胞を 100 µg/ml の hBD-3 とともに 400 分培養すると、断片化した DNA に結合した FITC により、核が緑色の蛍光を示す TUNEL 陽性細胞がコントロールと比較して多く認められた。

TgCAGmBD6-2 マウスにおいて、共通の特異的な異常が見出された。

筋線維における NCAM の発現の上昇は、再生線維に認められるほか、神経原性筋疾患でよく報告されている。しかし、我々のマウスでは、脊髄前角の運動ニューロンの数や末梢神経に、明らかな病理学的異常は認められず、むしろ筋線維の再生過程を反映しているか、あるいは神経筋接合部の障害を反映していると思われる。

一方、ヒトやマウスにおいて、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解に関わるカルパイン3の変異によって、筋ジストロフィーの発症することが知られている。TgCAGmBD6-1 マウスや高齢の TgCAGmBD6-2 マウスにおいても、I $\kappa$ B $\alpha$  の蓄積した筋線維が認められ、その一部に活性型カスパーセ3の存在が示されたことより、その筋変性に NF- $\kappa$ B 系の関与している可能性が示唆される。

我々の研究は、defensin の哺乳類細胞自身への作用が、個体レベルで疾患をきたしうることを明確に実証した初めての知見である。これまでの動物モデルの研究は、defensin の感染防御上の重要性を示すものであった。しかし、defensin は、免疫系のエフェクター因子としての機能だけでなく、炎症反応の制御にも関わり、またそれ自身、細胞毒性を有する。したがって、defensin の過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患を惹起するものと思われ、炎症性肺疾患との関連も示唆される。

さらに、TgCAGmBD6-1 マウスは、低体重、筋力低下、骨密度低下、寿命の短縮を示し、老化の促進に類似した所見であ

り、興味深い。

培養細胞に対する作用として、hBD-3 の急性の細胞毒性が確認され、細胞膜透過性亢進がその主要な原因と考えられた。しかし、時間を経ると DNA 損傷の所見も観察され、分子機構の解明は、今後の課題である。

## E. 結論

defensin の過剰発現により、筋線維の変性やが惹起された。defensin が、感染防御に寄与する一方で、その発現制御の異常が、炎症性肺疾患を含む様々な病態形成に寄与する可能性を示唆している。特に、この defensin 過剰発現マウスの表現型は、筋の変性疾患に類似するとともに、寿命の短縮、低体重、骨密度低下など、老化の促進を示唆する所見でもあり興味深いと考える。

## F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yamaguchi Y et. al.  $\beta$ -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan 10; in press

#### 2. 学会発表

1) 山口泰弘 ら.  $\beta$ -ディフェンシンの過剰発現により惹起される筋線維変性と骨量低下 第 48 回日本老年医学会学術集会 (2006)

2) Yamaguchi Y. et. al. The molecular mechanism of human  $\beta$ -defensin cytotoxic effects on mammalian cells 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory (APSR) (2006)



18年度分担研究報告書

脂質メディエーターによる生体制御機構の解析

-LPA<sub>4</sub>受容体を介したLPAの生物作用-

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 助教授

研究要旨

リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) は特異的な三量体 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して多彩な生理活性を示す脂質メディエーターである。LPA は特に神経細胞の形態や生存に影響を及ぼす。2003 年に私どもは、p2y<sub>9</sub> または GPR23 と呼ばれていたリガンド不明の GPCR が、新しい第 4 番目の LPA 受容体 (LPA<sub>4</sub>) であることを突きとめ報告した (Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 25600–25606)。神経細胞における LPA<sub>4</sub> の機能を評価するために、本研究では内在性の LPA 反応性を欠いたラット神経芽細胞腫由来の B103 細胞を用いた。LPA<sub>4</sub> を安定発現した B103 細胞において、G<sub>q/11</sub> 依存性 Ca 反応が LPA によって惹起されたが、アデニル酸シクラーゼ活性への影響は認められなかった。さらに、この細胞は LPA に反応して顕著な細胞形態変化、すなわち神経突起の退縮、細胞凝集、カドヘリン依存性細胞間接着を示した。これらの形態変化には低分子 G タンパク質 Rho を介した細胞内シグナルが関わっていることが明らかになった。したがって、これらの結果は、LPA<sub>4</sub> が LPA<sub>1</sub> と同様に G<sub>q/11</sub> と G<sub>12/13</sub> と共役する一方で、LPA<sub>1</sub> と違って G<sub>i/o</sub> とは共役していないことを示している。LPA<sub>4</sub> は神経突起退縮と細胞凝集作用を通して、神経発生や神経細胞移動などの生物学的機能を持つ可能性がある。

1-A. 研究目的

LPA は生体内に存在する生理活性脂質の一つで、細胞の成長や移動、分化などを制御していると考えられている。LPA の作用は細胞膜表面に発現する特異的 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を活性化することで細胞内に及ぶ。EDG ファミリーに属するアミノ酸配列の相同性が高い 3 つの受容体 (LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub>) が主な LPA に特異的な GPCR であ

る。薬理的解析によると、LPA<sub>1</sub> と LPA<sub>2</sub> は少なくとも G<sub>i/o</sub>、G<sub>q</sub>、G<sub>12/13</sub> の 3 種類の G タンパク質と共役しているが、LPA<sub>3</sub> は G<sub>i/o</sub> と G<sub>q</sub> のみで G<sub>12/13</sub> とは共役していないとされている。LPA 受容体の種類とそれら分子が共役する G タンパク質の種類に応じて、LPA は多彩な細胞内シグナリング経路を活性化すると考えられる。

脳には LPA が他の臓器に比して豊富に存在すると報告されている。また、

神経細胞の細胞株や神経前駆細胞、初代培養神経細胞に対し、LPAは細胞の形態変化を引き起こす。他に神経細胞の生存や細胞周期に影響を与えるとも報告されている。LPA<sub>1</sub>欠損マウスには嗅覚の障害や行動異常が認められており、神経因性疼痛の発症に関わるとの報告もある。発生途中のマウス大脳皮質にLPAを試験管内で投与すると、折畳み構造が顕著になるが、LPA<sub>1</sub>とLPA<sub>2</sub>の二重欠損マウスではこのLPAの薬理作用は観察されない。LPAの神経細胞に対する作用のうち、上記のように責任受容体が明らかになったはあるものの、未解明なものも依然として残っている。

2003年に私どもは、p2y<sub>9</sub>またはGPR23と呼ばれていたリガンド不明のGPCRが、LPAに反応することを突きとめ報告した。4番目のLPA受容体であったことからLPA<sub>4</sub>と命名したこのGPCRは、興味深いことにEDGファミリーに属するLPA<sub>1-3</sub>とはアミノ酸配列の相同性が低かった。LPA<sub>4</sub>はラットの胎児海馬由来神経細胞や不死化した海馬神経前駆細胞で発現するとの報告がある。これらの事実から、LPA<sub>4</sub>が神経発生や神経細胞移動といった神経系の発達過程に重要な役割を果たしている可能性が予想される。しかしながら、このLPA受容体の解析は進んでおらず、神経系における機能は不明である。そこで本研究では、LPA<sub>4</sub>を安定発現させた神経細胞株を用いて、この受容体の神経系における機能を明らかにすることを試みた。

## 1-B. 研究方法

### LPA<sub>4</sub>安定発現細胞株の樹立

LPA<sub>4</sub>遺伝子のオープンリーディング

フレーム内にはイントロンが存在しない。そこでヒトゲノムDNAを鋳型とした入れ子PCRにより、LPA<sub>4</sub>をコードするDNAをクローニングした。この際、N末端に9アミノ酸より成るHAエピトープタグを付加した。このクローンを、強力なmRNA発現を可能にするCAGプロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター(pCXN2.1)に挿入し、ラット神経芽細胞腫由来のB103細胞にトランスフェクションした。その後、G418で薬剤選択をかけ、トランスフェクションの26日後にG418耐性細胞群を得た。GPCRは7回膜貫通型構造で、そのN末端は細胞膜の外側に位置する。従って、HAエピトープタグが細胞膜表面に多く検出される細胞株は、受容体を高発現していると考えられる。この理論に基づき、このG418耐性細胞株群について抗HA抗体で蛍光染色して蛍光強度の強い細胞を選択的にフローサイトメーターで分取することで、ポリクローナルなLPA<sub>4</sub>の安定高発現細胞群を取得することができた。この細胞群はモノクローナルな細胞と比べ、細胞機能に偏りが無いと考えられるので、導入したLPA<sub>4</sub>の機能を観察するのに適している。ヒトLPA<sub>1</sub>のcDNAはヒト脳のポリ(A)+RNAをRT-PCRによって得た。これをもとに、LPA<sub>4</sub>と同様にN末端にHAタグを付加したLPA<sub>1</sub>のcDNAを入れ子PCRで調製し、ポリクローナルな安定高発現B103細胞群を取得した。

### cAMP濃度の測定

コラーゲンでコートした96ウェルプレートに細胞(3.2 × 10<sup>4</sup>個)を播種

し、無血清培地で24時間培養した。バッファーA (25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4] と0.1% BSAを含むHBSS)で二回洗い、0.5 mM IBMXを含む100  $\mu$ lのバッファーAで常温において15分間処理した。その後、50  $\mu$ M フォルスコリンの存在下で細胞を種々の濃度の1-オレオイル (18:1) LPA (Avanti 社)で常温において30分間刺激し、反応を停止するために終濃度1% Tween 20を加えた。4°Cで一晩静置した後、上清に含まれるcAMP濃度をPerkinElmer社のAlphaScreen cAMP Functional Assay KitとFusion Systemで検出した。

LPA受容体がアデニル酸シクラーゼを活性化することを検討する実験では、細胞を0.1% BSAを含むHEPES-タイロードバッファー (25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.37 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM D-グルコース) (HEPES-タイロード-BSA バッファー)で二回洗い、0.5 mM IBMXを含むHEPES-タイロード-BSA バッファーで37°Cにおいて15分間処理した。その後、細胞を種々の濃度のLPAで37°Cにおいて30分間刺激した。細胞溶解液を加えて反応を停止し、溶解液中のcAMP含量をGE Healthcare社のcAMP Biotrack EIA Kitを用いて測定した。

#### 細胞内Ca濃度の測定

コラーゲンコート10 cmディッシュに播種した細胞を無血清培地で24時間培養した。2 mM EDTAを含むPBSで細胞をディッシュからはがし、HEPES-タイロード-BSA バッファーで洗った後、3  $\mu$ M Fura2-AM (同仁社)を37°C

で1時間取り込ませた。HEPES-タイロード-BSA バッファーで二回洗い、 $1 \times 10^6$ /mlの濃度に調整した。CAF-100 蛍光光度計 (日本分光社)に0.5 mlの細胞懸濁液をセットし、LPAを作用させながら340 nm及び380 nmの波長の光を当て、その際に発した蛍光の強度比から細胞内Ca濃度の変化を求めた。

#### 細胞円形化アッセイ

ポリ-D-リジンでコートした12ウェルプレートに細胞 ( $1.0 \times 10^4$ 個)を播種した。24時間後に無血清培地に交換し、さらに24時間培養した。更なる培地交換の3時間後に細胞を1  $\mu$ M LPAで15分間刺激した。神経突起や糸状仮足を欠いた円形の形態を示す細胞の割合を、1ウェル当たり200個以上の細胞を調べて算出した。

#### Rho阻害アッセイ

ポリ-L-リジンでコートした35 mmディッシュに細胞 ( $1.0 \times 10^4$ 個)を播種した。24時間後に、ポツリヌス菌C3細胞外酵素の発現ベクター (pEF-C3) または空ベクター (pEF-BOS)をEGFPの発現ベクター (pEGFP-1)と4:1の重量比で混ぜた計3  $\mu$ gのDNAを細胞へトランスフェクションした。24時間後に細胞をポリ-D-リジンでコートした12ウェルプレートに移し、さらに24時間培養した。無血清培地で12時間培養の後、1  $\mu$ M LPAで15分間刺激した。1%パラホルムアルデヒド固定の後、EGFPを発現する細胞を蛍光顕微鏡で検出した。そのうち、神経突起や糸状仮足を欠いた円形の形態を示す細胞の割合を、20視野以上で100個以上の細

胞を調べて算出した。

### 細胞凝集の定量

ポリ-D-リジンでコートした 24 ウェルプレートに細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) を播種した。24 時間後に無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。更なる培地交換の 3 時間後に細胞を  $1 \mu\text{M}$  LPA で 3 時間刺激した。細胞を固定し、ディフクイックで染色した。凝集した細胞の分布の様子を写真撮影し、任意の  $1710 \mu\text{m} \times 1290 \mu\text{m}$  の長方形部分を取り出した。ここに  $30 \mu\text{m}$  グリッドを描いて 2451 個の正方形に分割した。1 つも細胞核含まない正方形の割合を算出して、細胞凝集の程度を示すパラメーターとした。

### 細胞凝集塊解離アッセイ

ポリ-D-リジンでコートした 35 mm ディッシュに細胞 ( $5 \times 10^5$  個) を播種した。一晚培養の後、無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。細胞を  $1 \mu\text{M}$  LPA で 2 時間刺激して、凝集塊を形成させた。2 mM  $\text{CaCl}_2$  または EDTA を含む HBSS で細胞を洗浄し、0.01% トリプシンで  $37^\circ\text{C}$  において 30 分間処理した。穏やかに 10 回ピペッティングして細胞塊を解離させ、生じた小さくなった塊の数を細胞カウンターで数えた。 $\text{CaCl}_2$  存在下における細胞塊の数 (TC) と EDTA 存在下における細胞塊の数 (TE) の比を計算して Ca 依存性の細胞間接着の程度を見積もった。

### 免疫蛍光染色

ポリ-L-リジンでコートしたガラスボトム 35 mm ディッシュに細胞 ( $3.5 \times$

$10^5$  個) を播種した。一晚培養の後、無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。 $37^\circ\text{C}$  において細胞を  $1 \mu\text{M}$  LPA で 3 時間刺激して固定した。細胞膜の透過処理の後に N-カドヘリンに対するモノクローナル抗体と反応させた。Alexa-488 標識の二次抗体で一次抗体の結合を可視化し、Carl Zeiss 社の LSM510 共焦点顕微鏡で観察した。

### 統計解析

図中のすべての値は平均土標準誤差で示した。統計学的な有意さは、Turkey-Kramer テストをポストホックテストとした分散分析で値を比較することによって判定した。 $p < 0.05$  のときを「有意差有り」と判定した。

### (倫理面への配慮)

すべて試験管内における研究であり、またヒトのサンプルは研究者本人のもの若しくは試薬として購入したもので、倫理的問題発生しないと判断し特別な措置は講じていない。

### 1-C. 研究結果

#### $LPA_1$ と $LPA_4$ の B103 細胞における安定発現

神経細胞における  $LPA_4$  の機能を調べるために、B103 ラット神経芽細胞腫細胞に  $LPA_1$  または  $LPA_4$  を安定発現させた。この細胞を選択したのは、内在性の LPA への反応性を欠いているとの報告があったからである。予期したとおり、空ベクターをトランスフェクションしただけの細胞から得られた細胞膜画分には、 $^3\text{H}$  ラベルされた LPA への結合活性は認められなかった。B103 細胞